

# Translation of Reference 1:

Japan Society for Bacteriology No. 75 plenary session on April 4-6, 2002

by Tsuyoshi YOSHIMURA, Hitoshi KOMATSUZAWA, Junko TAKAHASHI, Katsuyuki KOUZAI, Motoyuki SUGAI (Hiroshima University etc.)

## Hydrolase of peptidoglycan produced by streptococci in oral cavity.

**Object:** The principal normal flora in oral cavity is streptococci. On hydrolases of peptido glycans (PGH) produced by oral streptococci, we searched PGH specific to each bacterial species and compared the difference among the bacterial species by using 5 representative bacterial species and by profiling proteins showing bacteriolytic activity in Zymography.

**Methods:** Crude enzyme fractions were obtained as 4% SDS extracts of bacterial cells from 5 strains in each species of *S. mutans* (*S. mut*), *S. sorbrinus* (*S. sob*), *S. sanguis* (*S. san*), *S. mitis* (*S. mit*) and *S. salivarius* (*S. sal*). Zymography was used for evaluation of activity. Zymography is a method for detecting bacteriolytic enzyme activity after SDS-PAGE by the use of polyacrylamide gel containing heat-killed bacterial cells. As the killed bacterial cells, boiled bacterial cells in 4% SDS for 30 min derived from a strain in each of the above 5 bacterial species, and said boiled bacterial cells treated afterwards with HF for removal of teichoic acid were used.

**Results:** Different bacteriolytic activity patterns based on the different bacterial species were observed for crude enzyme fractions. It was confirmed that treatment of substrates with HF clarified the bands of bacteriolysis. For all 4 bacterial species except *S. san* used as a substrate, *S. mut*- and *S. sob*-crude enzyme fractions showed activity at 100, 80, and 78 kDa. For two bacterial species such as *S. mit* and *S. sal*, but not for other species used as a substrate, *S. mit* crude enzyme fraction showed weak enzyme activity at 60, 45 and 30 kDa; and *S. sal* crude enzyme fraction showed two patterns of weak activity at 100, 90 and 60 kDa or 60, 50 and 45 kDa. *S. san* crude enzyme fraction did not show clear activity band for any substrates.

03 5200 6007

整理番号:PS03-1603 送付番号:720000 送付日:平成21年10月30日

2/E

本複製物は、特許庁が著作権法第42条第2項第1号の規定により複製したものです。  
取扱いにあたっては、著作権保護とならないよう十分にご注意ください。

①

## Reference 1

日本細菌学会誌 57(1), 2001

0315

2022

口腔連鎖球菌の産生するペプチドグリカン加水分解酵素

調査

○吉村純、小松澤幸、高橋幸子、青木亮之、  
青井善行

(広島大学・歯・応用口腔医学部、広島大学・歯・口腔健康  
科学部)

2021

A群レンサ球菌シャペロンタンパクGpEの菌体表面での存在

○村上知平、川崎雄志、寺岡豊、中川一馬、  
矢野貴雄、須田直樹

(新大井・歯・口腔医学部、新大井・歯・口腔健康科学部)

【目的】 A群レンサ球菌 (GAS) の菌体表面に皮細胞への付着・侵入には、唾液タンパクが介在する。これまでの研究により、唾液中の高プロリンタンパク (PRP) が、GASの産生Hsp-2産物への付着を起すことを見出し、PRPに結合するタンパクとして、GAS菌体のシャペロンタンパクGpEを同定した。本研究では、通常菌体内に存在していると考えられるGpEの菌体表面への出現およびその機能を菌体表面で検討した。

【方法】 SSS株 (ATCC) のgpe遺伝子をpGEX-6P-1ベクターに挿入し、大腸菌XL-10 Goldで産生タンパクGpEを産生させた。これをマウスに免疫し、抗GpE抗体を得た。GAS菌体をブロッキング後、抗GpE抗体 (1:100) とAlexa Fluor 568標識抗体 (1:1,000) によりGpEを染色した。さらにSYBR Green II RNA Gel Stain (1:20,000) を添加して菌全体を緑に染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。また、金コロイド標識抗GpE抗体を用いて、走査型電子顕微鏡下でGpEの局在を観察した。

【結果・考察】 共焦点レーザー顕微鏡観察において、一次抗体として正常ウサギ血清を用いた場合には菌体表面部位を多くに染色し、抗GpE抗体を用いると菌体の二分部位が強く染色された。ブロッキングにヒトIgG1 (50 µg/ml) を添加した場合、菌体表面と菌体内の染色が減少した。したがって、抗GpE抗体がGAS菌体表面に存在する免疫グロブリン結合タンパクと結合する可能性は除外され、GpEが菌体表面に免疫されることを示唆された。さらに、走査型電子顕微鏡下で観察したところ、GASの分枝菌体周囲に局在してGpEが発見されていることが明らかとなった。以上より、菌体の分枝菌体周囲に局在したGpEが、PRPとの結合を介してGASの菌体表面皮細胞への付着に関与することが示唆された。

【目的】 口腔の常在菌叢の主体は連鎖球菌である。口腔連鎖球菌の産生するペプチドグリカン加水分解酵素 (PGH) について、代表的な5菌種を用い、Zymographyにおいて酵素活性を示すタンパクのプロファイリングを行い、各菌種特有のPGH酵素および菌種間の比較検討を行った。

【方法】 *S. mutans* (S. mut), *S. sobrius* (S. sob), *S. sanguis* (S. san), *S. mitis* (S. mit), *S. salivarius* (S. sal) について各々5株ずつ菌体より4% SDS抽出を行い、菌体抽出液を得た。活性の検討にはZymographyを用いた。Zymographyとは酵素反応産物を含むポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、その後、酵素反応活性を検出する方法である。菌体抽出液は5割量1株ずつ4% SDSにて30分煮沸処理したもの、及びその残液をHIF処理し、タイコ凝縮したものを使用した。

【結果】 菌体抽出液では菌種によって異なる酵素活性パターンが観察され、各菌のHIF処理により菌種バンドの明瞭化が確認された。S. mut, S. sob菌体抽出液は、S. sanを除く4菌種を基質とした場合それぞれ100、80、78kDaに活性が観察された。S. mit, S. salの3菌種を基質として観察した場合にS. mut菌体抽出液は60、45、30kDaに活性が、S. sob菌体抽出液は100、90、60kDaと60、50、45kDaの2パターンの活性を示したが、その活性を基質とした場合には検出されなかった。S. san菌体抽出液はいずれの基質を用いても明瞭なバンドが得られなかった。